

DETERMINACIÓN DE LAS RELACIONES TRÓFICAS EN LA ACAROFAUNA DE CÍTRICOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Universitat Jaume I (UJI).
Campus del Riu Sec.
Castelló de la Plana. España.

¹ Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural.
Unitat Associada d'Entomologia UJI-IVIA, UJI.

² Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, UJI.

³ Departament de Matemàtiques, UJI.

Resumen

Los tetránquidos *Tetranychus urticae* y *Panonychus citri* son los ácaros plaga más importantes en los cítricos españoles. Ambas especies están asociadas a una comunidad de enemigos naturales en la que destacan los ácaros depredadores pertenecientes a la familia Phytoseiidae. Sin embargo, se desconoce cuál es la contribución real de estos ácaros depredadores en el control de ambas plagas en campo.

Las técnicas moleculares basadas en ADN son herramientas muy valiosas en estudios de depredación, especialmente en artrópodos como los fitoseidos en los que resulta difícil la aplicación de métodos tradicionales como la observación directa en campo. Estas técnicas permiten identificar tanto a los depredadores como a las presas que han sido ingeridas. Por ello, y por primera vez en ácaros, se ha diseñado una PCR multiplex que permite la identificación de hasta seis especies de fitoseidos, y la identificación y detección de *T. urticae* y *P. citri* en su contenido intestinal. Esta PCR multiplex demuestra ser una técnica equivalente a la identificación por taxonomía clásica en ácaros, y además es más eficaz y potente al superar algunas limitaciones de los procedimientos tradicionales, como es la posibilidad de detectar e identificar la presa ingerida.

Palabras clave: control biológico, PCR multiplex, tetránquidos, fitoseidos, clementino.

ACAROFAUNA EN CÍTRICOS

Los ácaros plaga más importantes en cítricos españoles pertenecen a la familia Tetranychidae. Entre ellos se encuentran las especies *Tetranychus urticae* Koch y *Panonychus citri* (McGregor), tradicionalmente descritas sobre mandarina clementino y naranjo dulce respectivamente (Abad-Moyano *et al.*, 2008; García-Marí, 2012), y *Eutetranychus banksi* (McGregor) y *Eutetranychus orientalis* (Klein) descritas en Andalucía desde 2001 y recientemente en la Comunidad Valenciana sobre distintas variedades de cítricos (Martín Gil y Llorens Climent, 2014; Generalitat Valenciana, 2015; Urbaneja *et al.*, 2016). Las infestaciones de *E. banksi*, *E. orientalis* y *P. citri*, provocan la aparición de un punteado plateado más o menos difuso en hojas y fruto, mientras que las de *T. urticae* ocasionan manchas cloróticas y/o abombamientos en el haz de las hojas y manchas herrumbrosas en la zona estilar y peduncular del fruto. El daño en fruto, sobre todo el producido por *T. urticae*, devalúa su calidad

comercial (Aguilar-Fenollosa *et al.*, 2014; Pascual-Ruiz *et al.*, 2014) y conlleva importantes pérdidas económicas, ya que la mayor parte de la producción nacional se destina a consumo en fresco (MAGRAMA, 2015).

Estos fitófagos se encuentran asociados a un rico complejo de enemigos naturales en el que destacan los ácaros depredadores pertenecientes a la familia Phytoseiidae. Estos ácaros depredadores tienen un gran valor económico, ya que se utilizan con éxito como agentes de control biológico frente a diversas especies plaga en todo el mundo (Helle y Sabelis, 1985). En cítricos españoles, las especies más abundantes en presencia de *T. urticae* y *P. citri* son *Euseius stipulatus* (Athias-Henriot), *Neoseiulus barkeri* Hughes, *Neoseiulus californicus* (McGregor), *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot y *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) *phialatus* Athias-Henriot (Abad-Moyano *et al.*, 2009; Aguilar-Fenollosa *et al.*,

2011) (Figura 1). No obstante, la abundancia de estos fitoseidos varía en función del tipo de gestión de la cubierta vegetal, ya sea suelo desnudo, flora espontánea o cubierta de *Festuca arundinacea* Schreber (Poaceae), si bien predomina la especie *E. stipulatus* independientemente del tipo de gestión (Aguilar-Fenollosa *et al.*, 2011; Jaques *et al.*, 2015).

RELACIONES TRÓFICAS DE LA ACAROFAUNA EN CÍTRICOS

Todos los hábitos alimenticios descritos en los fitoseidos se encuentran representados en las especies citadas: depredadores especialistas en especies del género *Tetranychus* (*P. persimilis*), depredadores selectivos de tetránquidos (*N. californicus*), depredadores generalistas (*N. barkeri* y *T. phialatus*) y depredadores generalistas palinófagos (*E. stipulatus*) (McMurtry y Croft, 1997; McMurtry *et al.*, 2013).

A pesar de sus diferencias, estas especies pueden alimentarse en mayor o menor medida de ácaros tetránquidos (Figura 1). Sin embargo, hasta ahora no se había demostrado qué presa habían comido en campo y por tanto cuál era la contribución real de estos depredadores como agentes de control de estos fitófagos plaga.

El estudio de la depredación de tetránquidos por fitoseidos es difícil de abordar en condiciones de campo utilizando los procedimientos habituales en otros grupos de artrópodos, como son la visualización directa de la depredación, la disección *post mortem* del depredador o el análisis de heces. El pequeño tamaño de los fitoseidos, sus hábitos crípticos, la ingesta de alimento en forma fluida o las efímeras interacciones de estos depredadores con la presa, hacen inviables tales procedimientos. El empleo de técnicas moleculares, entre las que destacan las basadas en ADN, puede superar esas limitaciones (Symondson, 2002; Hurtado *et al.*, 2008).

APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN ESTUDIOS DE RELACIONES TRÓFICAS

Las técnicas moleculares basadas en ADN aplicadas al estudio de las relaciones tróficas permiten desvelar la gama de presas potenciales de un depredador mediante el análisis molecular de su contenido intestinal, así como la identidad de los posibles depredadores para una misma presa (Symondson, 2002; King *et al.*, 2008; Furlong, 2015). Dentro del genoma de los ácaros, las regiones intergénicas ITS (del inglés *Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosomal nuclear resultan especialmente adecuadas para este propósito en ácaros, y pueden servir como punto de partida para el diseño de herramientas que permitan la identificación de depredador y presa.

Recientemente, un artículo publicado en la revista *Molecular Ecology Resources* por Pérez-Sayas y colaboradores (2015) presenta la aplica-



Figura 1. Principales especies de ácaros depredadores (familia Phytoseiidae) y plaga (familia Tetranychidae) en el agroecosistema cítrico español.

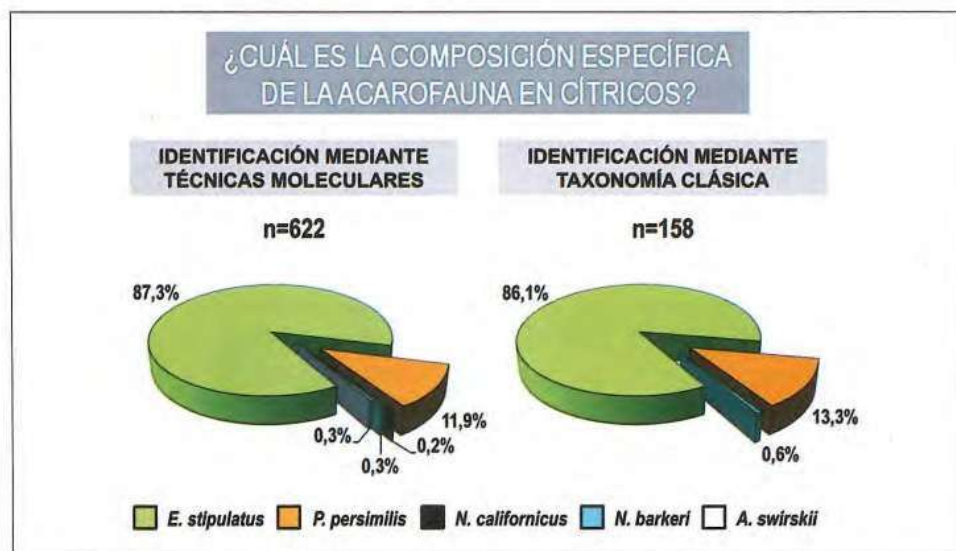


Figura 2. Composición específica de la acarofauna en cítricos mediante identificación molecular e identificación taxonómica.

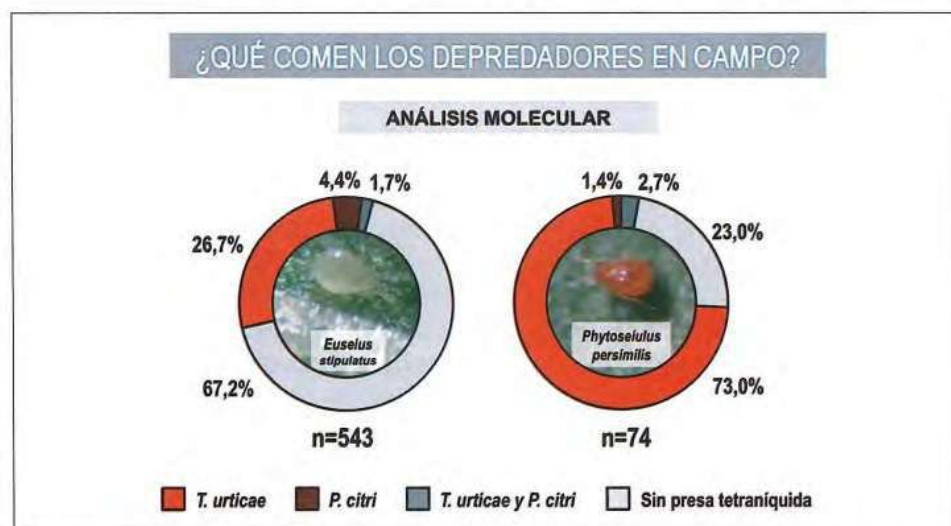


Figura 3. Detección molecular de tetránquidos presa en *Euseius stipulatus* y *Phytoseiulus persimilis*.

ción en campo de una PCR multiplex que, utilizando cebadores de ADN específicos de presa y depredador diseñados en esta región ITS, es capaz de desvelar las relaciones tróficas de la acarofauna en cítricos. La correcta incorporación de estos cebadores en una única reacción de amplificación (PCR multiplex) permite identificar simultáneamente hasta ocho especies de ácaros de cítricos, de las que dos pueden constituir plagas de este cultivo (*T. urticae* y *P. citri*) y seis son especies depredadoras de esas especies plaga (*Amblyseius swirskii* Athias-Henriot, *E. stipulatus*, *N. barkeri*, *N. californicus*, *P. persimilis* y *T. phialatus*). Además, esta técnica permite evaluar el impacto de estos depredadores en las plagas, ya que aporta valiosa información sobre la depredación de *T. urticae* y/o *P. citri*, al ser capaz de detectar e identificar una o ambas presas en el tracto intestinal de su depredador.

IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE LA ACAROFAUNA: TÉCNICAS MOLECULARES VS. TAXONOMÍA CLÁSICA

Pérez-Sayas y colaboradores (2015) demuestran la validez de la herramienta molecular desarrollada para la caracterización específica de ácaros depredadores, equiparándola a las técnicas de identificación por taxonomía clásica. Para ello, realizaron nueve muestreos en parcelas distribuidas en diferentes localidades de la Comunidad Valenciana. Estas parcelas presentaban una elevada densidad de *T. urticae* y/o *P. citri* y de ácaros fitoseidos. En cada parcela se seleccionaron 10 árboles de los que se recogieron muestras para ser procesadas mediante técnicas moleculares y técnicas clásicas. Para el análisis molecular, se capturaron e individualizaron 10 fitoseidos por árbol, y se fijó su ADN *in situ* sobre una membrana de nylon de forma que quedase interrumpida la digestión de la presa en el depredador. Una vez en el laboratorio, el ADN fija-

do era extraído, amplificado mediante la PCR multiplex diseñada y analizado en un secuenciador automático. El análisis de muestras mediante técnicas clásicas consistió en la identificación bajo lupa binocular de los ácaros, tetraníquidos y fitoseidos, extraídos mediante embudo Berlese de un total de 100 hojas (10 hojas por árbol) por parcela.

Con las técnicas moleculares, se identificó un total de 622 fitoseidos, de los cuales el 87,3% correspondió a la especie *E. stipulatus*, el 11,9% a *P. persimilis* y sólo un 0,8% a otras especies (*A. swirskii*, *N. barkeri* y *N. californicus*) (Figura 2). El resultado obtenido a través de técnicas clásicas fue similar al molecular, ya que de los 158 fitoseidos identificados taxonómicamente, un 86,1% correspondió a la especie *E. stipulatus*, un 13,3% a *P. persimilis* y un 0,6% a *N. barkeri* (Figura 2). Además, la abundancia relativa de *E. stipulatus* y *P. persimilis*, estimada en cada especie con ambas técnicas, estuvo fuertemente correlacionada en cada uno de los muestreos (correlación de Pearson; $P = 0,009$, $r = 0,801$; $P < 0,001$, $r = 0,965$, respectivamente). Estos resultados demuestran por tanto que ambos procedimientos (análisis molecular y taxonomía clásica) son igualmente válidos para la identificación de especies de fitoseidos. La proporción de *T. urticae* y *P. citri*, identificada mediante técnicas moleculares y clásicas no estuvo correlacionada ($P > 0,05$ en todos los casos). La presencia de uno u otro tetraníquido en el tracto intestinal del depredador dependió de su preferencia alimenticia, mientras que la identidad de la presa determinada mediante técnicas clásicas varió en función de su abundancia en la parcela.

DETECCIÓN DE TETRANÍQUIDOS EN EL CONTENIDO INTESTINAL DE FITOSEIDOS

El resultado más interesante obtenido por Pérez-Sayas y colaboradores (2015) responde a la pre-

gunta: ¿Qué están comiendo los depredadores en campo? El análisis molecular del contenido intestinal de *E. stipulatus* y *P. persimilis*, especies de fitoseidos más abundantes en los muestreos realizados, mostró diferencias en la preferencia alimenticia de estos depredadores. De los 543 *E. stipulatus* identificados, un 32,8% dió detección positiva de presa tetraníquida (26,7% *T. urticae*, 4,4% *P. citri* y 1,7% ambos tetraníquidos) (Figura 3, pág. 118). Este porcentaje se incrementó notablemente en el caso de *P. persimilis*, ya que de los 74 individuos identificados, el 77,1% había depredado este tipo de presa (73,0% *T. urticae*, 1,4% *P. citri* y 2,7% ambos tetraníquidos) (Figura 3).

Mediante este estudio se demuestra que *P. persimilis*, a pesar de estar catalogado como especialista en ácaros del género *Tetranychus* (McMurtry y Croft, 1997; McMurtry *et al.*, 2013), depreda activamente en campo la especie *P. citri*. Además, se ha comprobado que este fitoseido se comporta como mejor depredador de tetraníquidos en campo que *E. stipulatus*. Por tanto, se recomienda la protección y conservación de *P. persimilis* en cítricos, ya que es capaz de alimentarse eficazmente de ambos tetraníquidos.

En el caso de *E. stipulatus*, a pesar de que en un 67,2% de los individuos analizados no se detectó presa tetraníquida, la abundancia numérica de este fitoseido en campo (unas siete veces mayor que la de *P. persimilis*) hace que su papel en la regulación de las poblaciones de ambos tetraníquidos plaga sea importante.

CONCLUSIONES

Con el trabajo realizado por Pérez-Sayas y colaboradores (2015) se demuestra que la herramienta molecular basada en la PCR multiplex puede ser útil para la determina-

ción de la composición específica de ácaros, y permite además desvelar sus relaciones tróficas. El mayor alcance de este tipo de técnicas abre las puertas al esclarecimiento de las relaciones tróficas, no sólo de ácaros fitoseidos sino también de otros artrópodos de interés económico que puedan ser utilizados en favor de una agricultura más sostenible y respetuosa con el medioambiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Beatriz Sabater (Trinity College of Dublin), Ernestina Aguilar-Fenollosa, Loredana Scalschi y Amelia Simó (UJI) el consejo técnico, a Begonya Vicedo (UJI) el soporte logístico, y a Juan Ramón Boyero (IFAPA, Churriana, Málaga), Pablo Alvarado (Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal, Huelva), Ahlem Harbi, Khaled Abbas y Poliane Sá Argolo (IVIA) su ayuda durante los muestreos de ácaros. Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-05287-C04/AGR y AGL2011-30538-C03-01) y el programa de investigación de la Fundación Bancaixa - Universitat Jaume I (P1-1A2005-03 y P11B2008-02). Tatiana Pina fue receptora de un contrato posdoctoral (PICD) de la UJI.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Moyano R., Aguilar-Fenollosa E., Pascual-Ruiz S. 2008. Control biológico de ácaros. En: J.A. Jacas y A. Urbaneja (Eds.). Control biológico de plagas agrícolas, 10, pp. 151-164. M.V. Phytoma-España, S.L. (Phytoma-España).
- Abad-Moyano R., Pina T., Dembilio Ó., Ferragut F., Urbaneja A. 2009. Survey of natural enemies of spider mites (Acari: Tetranychidae) in citrus orchards in eastern Spain. *Experimental and Applied Acarology*, 47, 49-61.
- Aguilar-Fenollosa E., Ibáñez-Gual M.V., Pascual-Ruiz S., Hurtado M., Jacas J.A. 2011. Effect of ground-cover management on spider mites and their phytoseiid natural enemies in clementine mandarin orchards (II): Top-down regulation mechanisms. *Biological Control*, 59, 171-179.
- Aguilar-Fenollosa E., Pascual-Ruiz S., Ibáñez-Gual M.V., Hurtado M., Martínez Ferrer M.T., Jacas J.A. 2014. Umbrales económicos para la araña roja *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) en mandarina. *Levante Agrícola*, 423, 233-242.
- Furlong M.J. 2015. Knowing your enemies: integrating molecular and ecological methods to assess the impact of arthropod predators on crop pests. *Insect Science*, 22, 6-19.
- García-Marí F. 2012. Plagas de los cítricos. Gestión integrada en países de clima mediterráneo. M. V. Phytoma-España, S.L. (Phytoma-España).
- Generalitat Valenciana. 2015. Nota informativa *Eutetranychus* spp. Septiembre 2015. <http://www.agroambient.gva.es/documents/170659/162156726/Nota+informativa+Eutetranychus+spp%2C%20septiembre+2015-b39e92ea09aa.pdf/dc9b3574-1654-4a77-a7e3> (acceso 25 de abril de 2016).
- Helle W., Sabelis M.W. (Eds.). 1985. Spider Mites. Their Biology, Natural Enemies and Control. World Crop Pests, Vol. 1B. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- Hurtado M., Agustí N., Sabater-Muñoz B. 2008. Aplicación de técnicas moleculares al control biológico de plagas. En: J.A. Jacas y A. Urbaneja (Eds.). Control biológico de plagas agrícolas. Futuro del control biológico, 30, pp. 453-468. M.V. Phytoma-España, S.L. (Phytoma-España).
- Jaques J.A., Aguilar-Fenollosa E., Hurtado-Ruiz M.A., Pina T. 2015. Food web engineering to enhance biological control of *Tetranychus urticae* by phytoseiid

- mites (Tetranychidae: Phytoseiidae) in citrus. En: D. Carrillo, G.J. de Moraes y J.E. Peña (Eds.). Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms, Vol. 19, pp. 251-269. Springer International Publishing. Springer International Publishing Switzerland.
- King R.A., Read D.S., Traugott M., Symondson W.O.C. 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology*, 17, 947-963.
- MAGRAMA. 2015. Anuario de Estadística 2014. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid (España).
- Martín Gil Á., Llorens Climent J.M. (Coords.). 2014. Guía de gestión integrada de plagas. Cítricos. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid (España).
- McMurtry J.A., Croft B.A. 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annual Review of Entomology*, 42, 291-321.
- McMurtry J.A., De Moraes G.J., Sourassou N.F. 2013. Revision of the lifestyles of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) and implications for biological control strategies. *Systematic and Applied Acarology*, 18, 297-320.
- Pascual-Ruiz S., Aguilar-Fenollosa E., Ibáñez-Gual, M.V., Hurtado M., Martínez-Ferrer M.T., Jacas J.A. 2014. Economic threshold for *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in clementine mandarins *Citrus clementina*. *Experimental and Applied Acarology*, 62, 337-3621.
- Pérez-Sayas C., Pina T., Gómez-Martínez M.A., Camañes G., Ibáñez-Gual M.V., Jaques J.A., Hurtado M.A. 2015. Disentangling mite predator-prey relationships by multiplex PCR. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1330-1345.
- Symondson W.O.C. 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11, 627-641.
- Urbaneja A., Planes L., Catalán J., Jacas J.A. 2016. Tetránquidos. En: A. Urbaneja, J. Catalán, A. Tena y J.A. Jacas (Eds.). Gestión Integrada de Plagas de Cítricos. Plagas principales y enfermedades. <http://gip-citricos.ivia.es/area/plagas-principales/tetranychidos/> acaro-rojo-oriental (acceso 25 de abril de 2016).



VADEMÉCUM DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS Y NUTRICIONALES. 2016

Autor: Carlos de Liñan

P.V.P. LIBRO (Incluye CD ROM.) 45 € (más gastos envío)

INDICE POR MATERIAS: Control de plagas.. Control de enfermedades.. Control de hierbas no deseadas. Modificadores del comportamiento vegetal. Tratamiento postcosecha. Coadyuvantes. Productos nutricionales.

ECOVAD 2016

VADEMÉCUM PARA LA PRODUCCIÓN ECOLÓGICA.

P.V.P. LIBRO. 30 €. (más gastos envío)

INDICE POR MATERIAS: Fungicidas. Insecticidas biológicos. Jabones y sales de ácidos grasos. Feromonas. Atrayentes. Insectos y depredadores. Microorganismos. Anioácidos. Extractos. Correctores específicos. Abonos orgánicos líquidos fondo y cobertura. Abonos orgánicos sólidos fondo y cobertura. Biofertilizantes. Enmiendas orgánicas. Ácidos húmicos. Ácidos fúlvicos. Enmiendas minerales. Turbas y sustratos de cultivo. Correctores de carencia.



Oferta Pack: VADEMÉCUM (Incluido CD ROM.) + ECOVAD 50 € (más gastos de envío)

Pedidos: EDICIONES Y PROMOCIONES LAV, S.L. Tel. 96 372 02 61. Fax. 96 371 05 156. - pedidos@edicioneslav.com